

市販食品에서 分離된 蛋白分解성이 강한 *Streptococcus* sp. 의 特性

張 東 錫 · 李 鍾 璇

釜山水産大學 食品工學科 오레곤州立大學校 食品工學科

Characterization of Proteolytic *Streptococcus* sp. Isolated from Market Foods

Dong-Suck CHANG

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan
Namgu, Pusan, 608 Korea

and

Jong S. LEE

Department of Food Science and Technology, Oregon State University
Corvallis, Oregon 97331, U. S. A

The proteolytic bacteria were isolated from the market foods such as ground beef, cooked shrimp meat, perch fillet, oyster meat, beef with textured vegetable protein and fish digest distributed at supermarket in Corvallis, Oregon, U. S. A.

Two hundred and twenty-eight strains(30.8%) have proteolytic activity from 740 strains isolated from the examined samples and the strongest proteolytic strain among them was identified as a *Streptococcus* sp. Its maximum growth was showed at about 6 hours culture at 37°C with shaking incubator in the medium added 0.15% potassium phosphate monobasic and 0.4% potassium phosphate dibasic, while the strongest activity of its extracellular protease was observed after 7 hours culture.

The exoenzyme produced by the *Streptococcus* sp. was observed as a metal chelator sensitive protease, which are strongly inhibited by EDTA and *o*-phenanthroline but not affected by phenylmethylsulfonyl fluoride and *p*-hydroxymercuribenzoate.

緒 論

食品의 腐敗는 주로 微生物의 作用에 依하는데 特別히 水産物이나 肉類등 蛋白質 食品의 腐敗는 蛋白質 分解酵素를 生産하는 微生物의 作用에 크게 支配받는다.

微生物이 生産하는 metal protease에 관한 研究는 Hall *et al.*(1966), Keay *et al.*(1970), Fogarty와 Griffin(1973), Levy *et al.*(1975)등 많이 있으나 대 상균주는 대부분 *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptomyces*屬에 관한 것이며 Kato *et al.*(1972), 東條등(1975), Sakada, *et al.*(1977, 1978) 등이 海水棲 bacteria가 生産하는 蛋白分解酵素에 관하여 報告한 바 있다. 한편 *Streptococcus* spp.에 관한 研究로는 Liu *et al.*(1963), Williamson *et al.*(1964), Thomas *et al.*(1974), Exterkate(1976, 1979) 등이 있으나 모두 *Sireptococcus* spp.의 cell wall에 存在하는

protease에 관한 것이고 이들 細菌이 生産하는 菌體外 中性 protease에 관한 研究는 거의 없다.

著者들은 美國 Oregon州 Corvallis 市內에 있는 super market에서 수집한 蛋白質 食品을 試料로 해서 一般細菌을 分離하고 그 中에서 蛋白質 分解能이 強한 菌株를 擇하여 細菌白體의 特性 및 이 菌이 生成한 菌體外 蛋白分解酵素의 特性을 實驗하였는데 本 報告에서는 細菌의 一般의인 特性과 培養特性에 관한 實驗結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 試 料

試料는 美國 Oregon州 Corvallis 市內에 있는 supermarket에서 ground beef, cooked shrimp meat, perch fillet, oyster meat, beef with textured vegetable protein, fish digest 등을 수집하여 細菌

을 分離하였다.

2. 菌株의 分離 및 同定

細菌의 分離實驗 過程은 Fig. 1과 같다. 試料에서 分離된 740菌株는 replica plating method(Lee and Pfeifer, 1975)와 Lee(1976)가 제안한 standard method with caseinate agar로서 蛋白質 分解성이

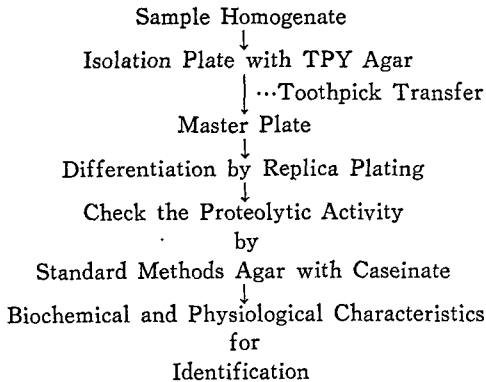


Fig. 1. Isolation Scheme for Proteolytic Bacteria.

제일 강한 菌株를 選擇하였다. 細菌의 特性을 밝히기 위한 實驗은 Harrigan과 McCance(1976), 微生物研究法懇談會編(1975)의 微生物學實驗法에 따랐으며 DNA의 guanine 과 cytosine의 mole percent는 對數增殖期의 細菌을 集積해서 Marmur와 Doty(1961)의 方法을 모방한 Seidler 등(1969)의 變法에 따랐는데 DNA의 melting point는 automatic recording spectrophotometer(Gilford Instruments, model 2000)로 260nm에서 測定하였다.

菌의 同定은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8版(1974), Gibbs와 Skinner(1966) 및 長谷川武治(1975)의 分類方法을 參考하였다.

3. 菌株의 培養特性調查

細菌의 培養 最適條件을 알기 위해서 TPY broth (peptone 0.5%, tryptone 0.5%, yeast extract 0.25%, NaCl 0.5%, glucose 0.1%) 100ml를 300 ml용 side arm flask(Bellco, Vineland, U. S. A)에 넣고 young broth culture를 接種하여 200 rpm으로 調整된 shaking incubator(New Brunswick Scientific Co., Inc.)에서 培養하면서 spectronic 20(Bauch and Lomb, U. S. A)으로 420nm에서 absorbance를 測定하여 菌의 增殖을 調查하였는데 溫度別 pH別로 實施하였다. 또 以上の 實驗에서 얻은 最

適條件下에서 TPY broth와 TPY broth에 KH_2PO_4 0.15%, K_2HPO_4 0.4%를 加하여 培養時間에 따른 酵素의 活性을 測定하여 酵素生成 最適時間을 調査하였다.

4. 酵素의 活性度 測定

菌體外 蛋白分解 酵素의 活性은 Rinderknecht *et al.*(1968)이 開發하고 그 뒤 Little *et al.*(1979), Canhos(1981)가 modify 한 不溶性의 hide powder azure(HPA, Calbiochem, U. S. A)를 利用하는 dye release method에 依하였다.

菌株를 TPY broth에 接種하여 optimum condition에서 7時間 培養한 培養液을 10,000×g, 4°C에서 15分間 遠心分離(Beckman model J2-21)한 후 0.45μ millipore filter paper로서 濾過한 濾液을 粗 酵素液으로 하였다. 酵素活性度의 測定은 2mM CaCl_2 가 포함된 0.05M Tris-HCl buffer 溶液 9ml에 酵素液 1ml를 加하여 溫度別로 30分間 preheating한 후 50mg HPA를 넣고 60分間 反應시킨 다음 whatman filter paper No.1으로 濾過하여 酵素의 反應을 停止시킨 후 spectronic 20으로 595nm에서 absorbance를 測定하였다.

結果 및 考察

1. 蛋白質 分解細菌의 分布

試料에 대한 細菌檢査 結果는 Table 1과 같다. 生 菌數는 $1.4 \times 10^5 \sim 3.2 \times 10^7/g$ 의 範圍였으며 加熱處理한 새우肉이 $1.4 \times 10^5/g$ 로 제일 낮았고 平均值는 $1.0 \times 10^7/g$ 으로 비교적 많은 細菌數가 檢出되었다. 또 試料別 蛋白質 分解細菌의 分布比率은 perch fillet이나 oyster meat에서 分離된 細菌의 50% 以上이 蛋白質 分解성이 있었으며 ground [beef에서는 分離된 130菌株中 41菌株로 31.5%였고 cooked shrimp meat의 경우는 120菌株中 3菌株 2.5%로 蛋白質 分解性細菌의 分布率은 제일 낮았다. 一般적으로 水産物腐敗細菌의 代表種이 *Pseudomonas* 屬이므로 加熱處理한 shrimp에서는 蛋白質 分解細菌의 分布가 제일 낮은 比率을 차지하고 있는 것으로 思料된다. 試料에서 分離된 總 740菌株中에서 蛋白質 分解성이 있는 細菌은 228菌株로 30.8%였다. 그러나 實驗室에서 菌株를 되풀이해서 계대 배양하는 동안에 蛋白質 分解能은 弱化되어 갔다. 그리고 계속해서 강한 分解能을 가지는 菌株는 49菌株로 6.6%에 지나지

市販食品에서 分離된 蛋白分解性이 強한 *Streptococcus* sp.의 特性

Table 1. Distribution of proteolytic bacteria in the food samples examined

Sample	Viable cell count/g ^a	Number of tested strains	Proteolytic bacteria	
			No. of strains	%
Ground beef	3.9×10 ⁶	130	41	31.5
Cooked shrimp meat	1.4×10 ⁵	120	3	2.5
Perch fillet	8.0×10 ⁶	160	84	52.5
Oyster meat	1.6×10 ⁷	184	96	52.2
Beef with textured vegetable protein	3.2×10 ⁷	70	4	5.7
Fish digest	7.4×10 ⁵	76	12	15.8
Total	1.0×10 ⁷	740	228	30.8

a: Average data of three times experiment

Table 2. Characteristics of *Streptococcus* sp. isolated from fish digest

Test	Response	Test	Response
Cell morphology	coccus(chain)	Casein hydrolysis	+
Gram reaction	+	Gelatin liquefaction	-
Spore formation	-	Utilization of	
Motility	-	citrate	-
Pencillin(3 I. U.)	Sensitive	mannitol	+
Mol % G+C	36.3	inositol	-
Indole	-	sorbitol	±
V-P test	-	rhamnose	-
Nitrate reduction	-	sucrose	-
Production of		arabinose	-
oxidase	-	melibiose	-
catalase	-	lactose	-
H ₂ S	-	Salt tolerance	0%
urease	-	at 37°C	6.5%
arginine dehydrolase	+		8.0%
lysine decarboxylase	-	pH range	5.5
pigmentation	-	for growth	9.6
Hugh-Leifson(glucose)		Temp range	10°C
fermentative	+	for growth	45°C
		Heat tolerance	60°C 30min survive

않았다. 또 生試料의 경우 魚貝類가 肉類에서 보다 蛋白質 分解性 細菌의 分布比率이 높았다.

2. 菌株의 特性

本 實驗에 提供된 總 740菌株 中에서 蛋白質 分解性이 제일 強했던 菌株의 特性은 Table 2와 같다.

形態學的으로 볼 때 Gram positive, non motile, non-spore forming 球菌으로서 chain을 形成하는 *Streptococcus* 屬으로 推定할 수 있었다. 또 catalase negative, gelatin 液化能 陰性, DNA의 guanine과 cytosine 含量, 糖分解能 등을 考察해 볼 때 *Streptococcus* group D에 屬하는 菌種으로 判定할 수 있

으나 Lactose 非分解性 10°C에서 자라지 않는 점, pH 9.6과 6.5% 食鹽은 培地에서 잘 자라지만 60°C 30分 加熱에서 견디는 점 등을 比較해 볼 때 species 를 定하기에는 不確實한 點이 많아서 *Streptococcus* 屬으로만 同定하였다.

3. 細菌의 生育과 酵素活性

TPY broth에 選定된 菌을 振盪 培養하면서 培養 時間에 따른 酵素活性, 菌體量, 培養液의 pH 變化를 測定한 結果는 Fig. 2와 같다. 培養初期 pH 7.0에서 부터 培養時間 經過에 따라 pH는 急激히 減少하기 始作하여 培養 5時間 後 pH가 5.15까지 減少

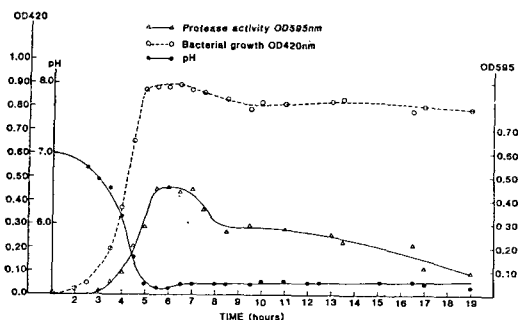


Fig. 2. Changes of bacterial growth, pH and activity of produced enzyme by the culturing time in TPY broth at 37°C.

하였고, 그 후에는培養 19時間까지 별變化가 없었다. 細菌의 增殖은 培養 6時間後에 maximum growth에 到達한 後 培養 19時間까지 별變化없이 absorbance 0.80을 유지하였다. 한편 菌體外 蛋白質 分解性 酵素의 生成은 培養 6時間경에 最高에 達하였다가 培養 8時間 경과후부터 19時間까지 徐徐히 減少하였다.

한편 TPY broth에 potassium phosphate를 加하여 같은 條件으로 培養한 結果는 Fig. 3과 같다. 培養液의 pH는 培養 5時間 經過했을 때 pH 6.5로 떨어진 뒤로는 培養 19時間까지 變化가 없었다. 細菌의 增殖 역시 培養 6時間頃에 maximum growth에 到達한 뒤부터 계속 absorbance 1.0으로서 potassium phosphate를 加하지 않은 培地에서 보다 良好하였다. 菌體外 酵素의 生成은 培養 3時間 後부터 急激히 活發하여 培養 7時間에 最高에 達한 후 11時間까지 큰 變動이 없었으며 時間의 經過에 따른 酵素活性의 減少는 아주 완만하였다. 그리고 potassium phosphate를 加하여 buffer action을 크게 했을 때 酵素의 最

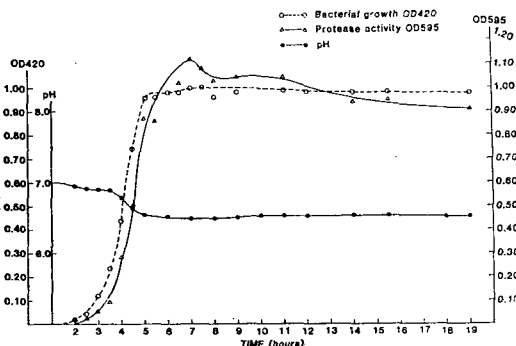


Fig. 3. Changes of bacterial growth, pH and activity of produced enzyme by the culturing time at 37°C in TPY broth buffered with potassium phosphate.

高活性度는 potassium phosphate를 加하지 않았을 때의 最高 活性度에 比하여 2.5배나 強하였다. 따라서 酵素의 生成은 TPY broth에 KH_2PO_4 0.15%, K_2HPO_4 0.4%를 加하고 培地의 pH를 7.0으로 調節한 다음 200 rpm으로 振盪培養했을 때 7時間 後에 最高의 酵素活性를 나타냄을 알 수 있었다.

4. 溫度에 따른 菌의 培養特性

最適條件의 培地에다 溫度條件만 다르게 하여 培養한 結果의 細菌 增殖度, 生成되는 酵素活性의 相對的인 比較結果는 Table 3과 같다.

細菌의 doubling time을 比較해 보면 37°C가 最適條件으로 24분이었는데 20°C의 103분에 比하면 4.3배나 짧았다. 그리고 20~25°C 사이에서 큰 差異를 나타내었으며 30°C와 45°C에서의 doubling time은 비슷하였으나 maximum growth는 30°C쪽이 많았다. Maximum growth까지 到達하는데 要하는 時間은 25°C에서 9時間, 30°C와 45°C에서는 다

Table 3. *Streptococcus* sp. growth and production of neutral protease by the temperature in TPY broth buffered with potassium phosphate(pH 7.0)

Temperature (°C)	Doubling time (min)	Maximum growth		Relative protease activity(%) after 7h incubation
		Absorbance at 420nm	Time required(h)	
20	103			
25	43	0.920	9.0	
30	30	0.990	7.3	72.6
37	24	0.980	6.0	100.00
45	32	0.840	7.3	26.3

Initial OD 420nm=0.005. Cells were cultured with shaking incubator in side arm flask

같이 7.3 시간이었으며 37°C에서는 6시간이었다. 細菌의 增殖이 良好한 30°C, 37°C, 45°C에서 各各 7 시간씩 培養하여 生成되는 菌體外 酵素의 活性은 37°C의 경우가 제일 良好하였다. 37°C에서의 酵素活性을 100으로 했을 때 30°C에서는 약 70, 45°C에서는 26으로 差異가 甚하였다. 30°C와 45°C의 경우 菌의 增殖速度는 비슷하였으나 maximum growth는 1.2배, 酵素의 活性은 2.8배나 30°C 側이 높았다. 즉 optimum 溫度보다 낮은 쪽이 높은 쪽보다 酵素의 生成이 良好함을 알 수 있었다.

5. 酵素의 分類

本 實驗에 使用된 菌株가 生成하는 菌體外 蛋白質分解酵素의 性質을 알아 보기 위해서 몇가지 酵素 阻害劑를 1mM 농도되게 加했을 때의 實驗結果는 Table 4와 같다.

Table 4. Effect of inhibitors on the proteolytic activity of the crude exoenzyme

Inhibitor(1mM)	Residual activity(%)
Control	100
Ethylenediaminetetraacetate(EDTA)	4.0
<i>o</i> -phenanthroline	3.4
Phenylmethylsulfonylfluoride	96
<i>p</i> -hydroxymercuribenzoate	100
L-1-tosylamido-2-phenylethylchloromethylketone	100

微生物이 生産하는 蛋白質分解酵素는 serine protease, thiol protease, metal-chelator sensitive protease 및 acid protease로 分類된다(Hartley, 1960) 그런데 Elliott와 Liu(1970)는 streptococcal proteinase는 papain이나 ficin같이 sulfhydryl enzyme이라 하였고 Morihara(1974)는 streptococcal protease는 sulfhydryl reagent에 感受성이 큰 thiol protease로 分類하고 있다. 한편 本 實驗에 使用된 *Streptococcus* sp.가 生成한 菌體外 蛋白質分解 酵素는 EDTA나 *o*-phenanthroline에 대해서는 強한 抑制作用을 받고 phenylmethylsulfonylfluoride, *p*-hydroxymercuribenzoate, L-1-tosylamido-2-phenylethylchloromethylketone 등에는 影響을 받지 않는 metal-chelator sensitive protease임을 알 수 있었다.

要 約

本 研究는 蛋白質 分解성이 強한 細菌을 分離하고 그 菌의 特性과 菌이 生成하는 酵素의 性質을 알기 위하여 市販食品 즉 ground beef, cooked shrimp meat, perch fillet, oyster meat, beef with textured vegetable protein, fish digest 등에서 細菌을 分離하였다.

分離된 740菌株中에서 30.8%에 해당하는 228菌株가 蛋白質 分解성이 있었으며 이 중에서 蛋白質 分解성이 제일 강한 菌株는 *Streptococcus* sp.였다. 本 菌株는 培地에 KH₂PO₄ 0.15%, K₂HPO₄ 0.4%를 添加하여 37°C에서 6時間 培養했을 때 maximum growth에 到達하였고 菌體外 蛋白質 分解酵素의 活性은 培養 7時間頃에 最高에 達하였다. 그리고 本 *Streptococcus* sp.가 生成한 菌體外 蛋白質分解酵素는 EDTA나 *o*-phenanthroline에 強한 阻害作用을 받고 phenylmethylsulfonylfluoride나 *p*-hydroxymercuribenzoate에 影響을 받지 않는 metal-chelator sensitive protease임을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

- 微生物研究會編, 1975. 微生物學實驗法 p.199-207. 講談社, 東京都 日本國.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th. ed., p.490-517. The Williams & Wilkins Co.
- Canhos, V.P. 1981. Microorganisms isolated from sand filtered bay water and the proteolytic activity of a *Flavobacterium* isolate. Ph.D. Thesis p.15-30. Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331, U. S. A.
- Elliott, S.D. and T.Y. Liu. 1970. Streptococcal proteinase. In *methods in enzymology* Vol. XIX, p.252-261. Perlmann G.E. and L. Lorands ed. Academic Press, New York, U. S. A.
- Exterkate, F.A. 1976. Comparison of strains of *Streptococcus cremoris* for proteolytic activities associated with the cell wall. *Neth. Milk Dairy J.* 30, 95-105.

- Exterkate, F.A. 1979. Accumulation of proteinase in the cell wall of *Streptococcus cremoris* strain AM₁ and regulation of its production. Arch. Microbiol. 120, 247—254.
- Fogarty, W.M. and P.J. Griffin. 1973. Physicochemical properties of the native zinc and manganese prepared metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. Appl. Microbiol. 26, 191—195.
- Gibbs, B.M. and F.A. Skinner. 1966. Identification methods for microbiologist. Academic Press, p. 65—76.
- Hall, F.F., H.O. Kunkel and J.M. Presscott. 1966. Multiple proteolytic enzymes of *Bacillus licheniformis*. Archives of Biochem. and Biophys. 114, 145—153.
- Harrigan, W.F. and M.E. McCance. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology p. 9—81. Academic Press.
- Hartley, B.S. 1960. Proteolytic enzymes. Ann. Rev. Biochem. 29, 45—72.
- Kato, N.T. Nagasawa, Y. Tani, and K. Ogata. 1972. Protease formation by a marine psychrophilic bacterium. Agr. Biol. Chem., 36, 1177—1184.
- Keay, L. and B.S. Wildi. 1970. Protease of the genus *Bacillus*. 1. Neutral proteases. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XII, 179—212.
- Lee, J.S. 1976. Proteolytic microorganisms. In compendium of methods for the microbiological examination of foods. Marvin L. Speck, ed., Prepared by APHA. p. 190—193.
- Lee, J.S. and D.K. Pfeifer. 1975. Microbiological characteristics of Dungeness crab (*Cancer magister*). Appl. Microbiol. 30, 72—78.
- Levy, P.L., H.K. Pangborn, Y. Bernstein, L. H. Ericsson, H. Neurath and K.A. Wash. 1975. Evidence of a homologous relationship between thermolysin and neutral protease A of *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Sci. U.S.A. 72, 4341—4345.
- Little, J.E., R.E. Sjogren and R.R. Carson. 1979. Measurement of proteolysis in natural waters. Appl. and Environ. Microbiol. 37, 900—908.
- Liu, T., N.P. Neumann, S.D. Elliott, S. Moore and W.H. Stein. 1963. Chemical properties of streptococcal proteinase and its zymogen. J. of Biol. Chem., 238, 251—256.
- Marmur, J. and P. Doty. 1961. A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. J. Mol. Biol. 3, 208—218.
- Morihara, K. 1974. Comparative specificity of microbial proteinases. Adv. Enzymol. 41, 87—96.
- 長谷川武治 編著. 1975. 微生物の分類と同定 p. 203—263. 東京大學出版會.
- Rinerknecht, H., M.C. Geokas, P. Silverman and B.J. Haverback. 1968. A new ultra sensitive method for the determination of proteolytic activity. Clinica Chimica Acta. 21, 197—203.
- Sakada, T., K. Ueda and D. Kakimoto. 1977. Studies on the proteases of marine bacteria. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ., 26, 63—78.
- Sakada, T., M. Nakaji and D. Kakimoto. 1978. Microflora in the digestive tract of marine fish. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. 27, 65—78.
- Seidler, R.J., M.P. Starr and M. Mandel. 1969. Deoxyribonucleic acid characterization of *Bdellvibrios*. J. Bacteriol. 100, 786—790.
- 東條敬・徳山龍明・淺野浩司. 1975. 海水棲のプロテアーゼ生成細菌に関する研究. 日本大學 農獸醫學部 學術研究報告 32, 140—170.
- Thomas, T.D., B.D.W. Jarvis and N.A. Skipper. 1974. Localization of proteinase near the cell surface of *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 118, 329—333.
- Williamson W.T., S.B. Tove and M.L. Speck. 1964. Extracellular proteinase of *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 187, 49—53.